



Figure 6. Immunoelectron microscopy of Aqp6 in the endolymphatic sac. Immunolabeled gold (10 nm, arrowheads) was seen in the intracellular region and the membrane of intracellular vesicles (asterisk) of the epithelial cells of the endolymphatic sac. Scale bar, 0.1 μm .

cells (Figure 2B, D, F, H). Positive immunoreactivity was considered to be specific to the Aqp6 polypeptide since the immunoreactivity disappeared when the primary antibody was omitted (data not shown). Immunoelectron microscopic studies revealed that the immunolabeled gold was diffusely seen in the intracellular area of the stria vascularis, the endolymphatic sac, and the vestibule (Figures 3, 4, 5, 6, 7B, 7C, 8B, 8C), and sporadically on the vesicular membrane (Figure 3B, 5B, 6, 7C, 8B, asterisks), but was absent or negligibly present in the plasma membranes. Immunogold Aqp6 labelings were observed at the small vesicular or tubular structures in the apical part of the marginal cells (Figure 3). Immunolabeled gold was also observed on the membrane of intracellular vesicles in the marginal cells (Figure 3B). Only a few immunogold Aqp6 labelings were observed in the apical site of the marginal cells (Figure 3B, C). Immunogold Aqp6 labelings of intracellular structures in the intermediate cell were few (Figure 4). Many immunogold Aqp6 labelings were observed at the small vesicular structures in the basal cells (Figure 5). Immunolabeled gold was also observed on the membrane of intracellular vesicles in the basal cells (Figure 5B). In the utricle and the saccule, there was the impression that the number of immunogold Aqp6 labelings in the supporting cells was more than that in the

sensory cells (Figures 7B and C, 8B and C). No difference was observed in immunogold Aqp6 labelings between the utricle and the saccule. Positive immunoreactivity was considered to be specific to the Aqp6 polypeptide since the immunolabeled gold was not seen when the primary antibody was omitted (data not shown).

Discussion

Aqps are membrane proteins that facilitate transmembrane osmotic water transport. In mammals, 13 types have so far been identified (Aqp0–12) [15,16]. Basically, Aqps are localized in the plasma membrane; however, Aqp6 is located in intracellular organelles or the cytoplasm, and has never been observed in the plasma membrane. In the kidney, it resides predominantly in intracellular vesicles in acid-secreting type A intercalated cells in the renal collecting ducts [12,17]. Unlike most other Aqps, the water permeability of Aqp6 is activated by Hg^{2+} , mercurials being generally known to inhibit the osmotic water permeability of Aqps, except for Aqp0 and Aqp4. Hg^{2+} also makes Aqp6 permeable to neutral hydrophilic molecules such as urea, glycerol and, to a minor extent, mannitol but not sucrose [18]. Surprisingly, Hg^{2+} and acidic external pH activate anion conductance by Aqp6. Although Aqp6 has unique characteristic features regarding its distribution and functions that are different from those of other Aqps, it may contribute to the maintenance of acid–base homeostasis and water balance in the kidney.

As to the inner ear, the expression of Aqp6 mRNA has been reported in the rat cochlea and endolymphatic sac [9]. The results of these RT-PCR studies were confirmed in the present study. Furthermore, Aqp6 mRNA was found to be expressed in the vestibule. The immunolocalization of Aqp6 protein was also found in the rat inner ear. In the cochlea, Aqp6 was diffusely expressed in the stria vascularis. Aqp6 was also expressed in epithelial cells of the endolymphatic sac, and in the sensory epithelium of the saccule and the utricle. It has been reported that Aqp6 was localized to the apical portion of interdental cells in the spiral limbus and vestibular supporting cells in the human inner ear [14]. But Aqp6 was not localized to the apical portion of interdental cells in the spiral limbus in this study. It is thought that the localization of Aqp6 in the inner ear

Figure 7. Immunoelectron microscopy of Aqp6 in the utricle. (A) Low-magnification view. Scale bar, 1 μm . su, supporting cell; se, sensory cell; arrows indicate hair bundles. (B) Higher-magnification view of the left boxed area in (A). Scale bar, 0.1 μm . (C) Higher-magnification view of the right boxed area in (A). Scale bar, 0.1 μm . Immunolabeled gold (10 nm, arrowheads) was diffusely seen in the intracellular region of the sensory cells and supporting cells of the utricle. There was the impression that the number of immunogold Aqp6 labelings in the supporting cells was more than that in the sensory cells. Immunolabeled gold was also observed on the membrane of intracellular vesicles (asterisk), but absent in the plasma membrane.

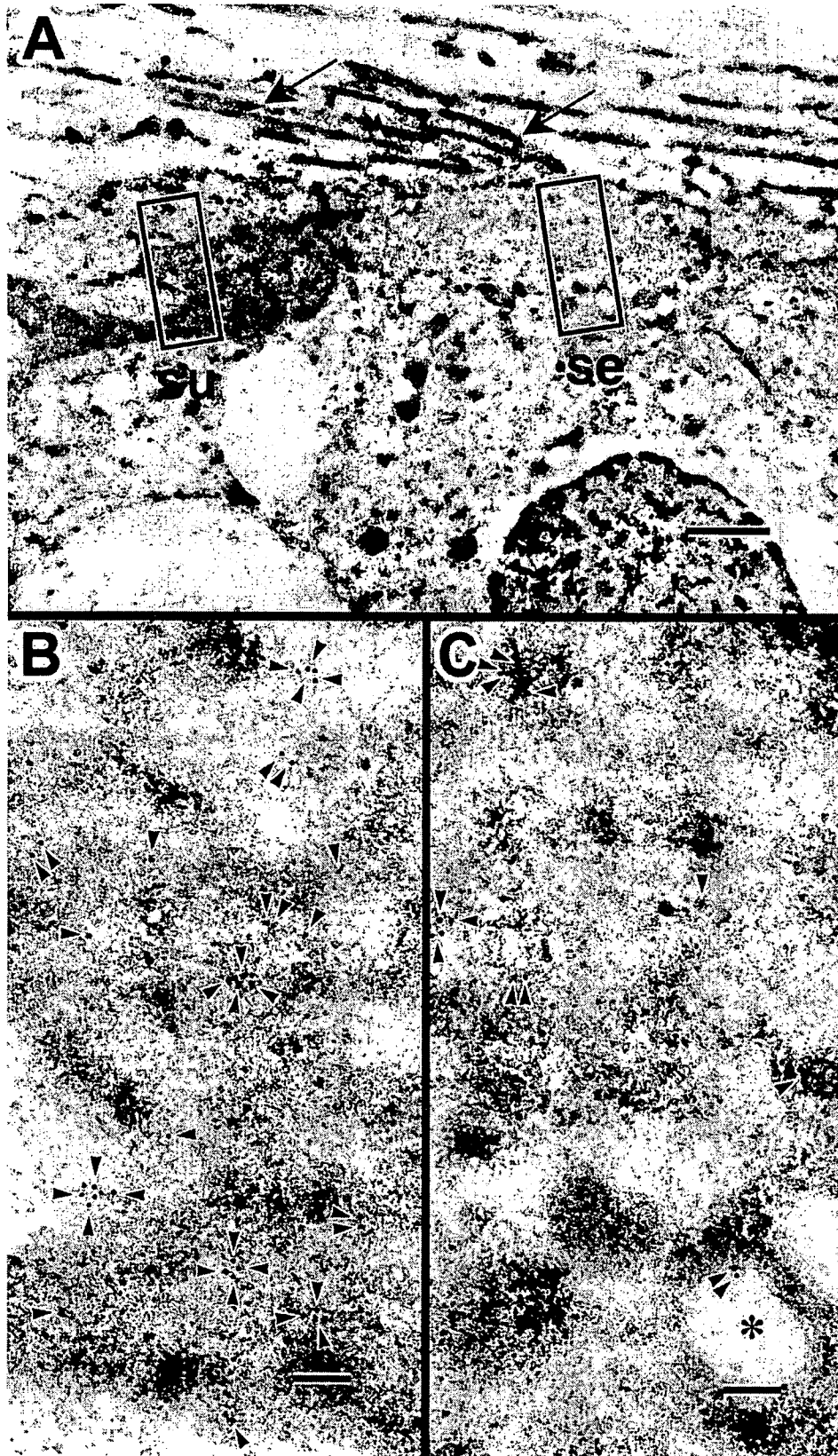


Figure 7 (Continued)

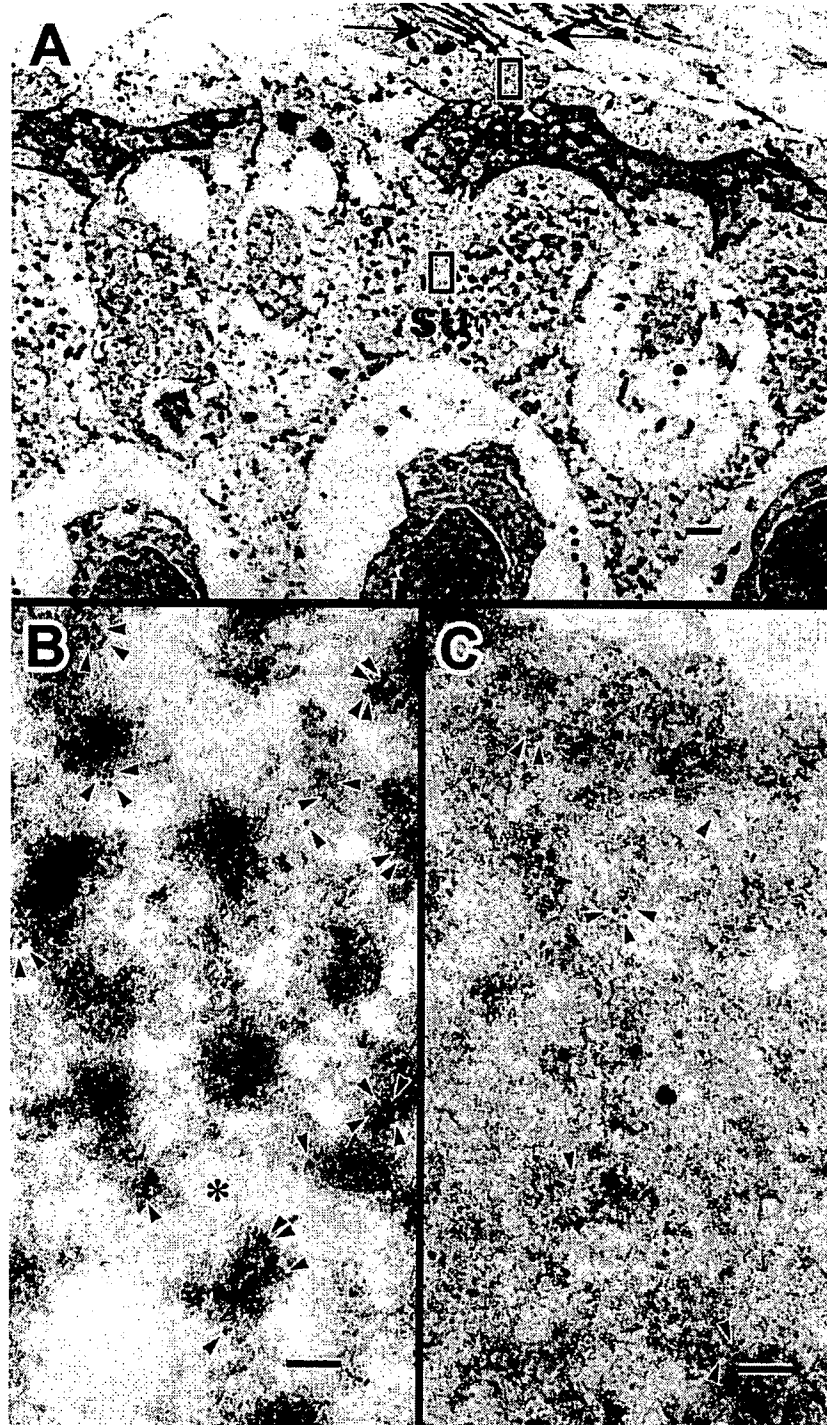


Figure 8. Immunoelectron microscopy of Aqp6 in the saccule. (A) Low-magnification view. Scale bar, 1 μm . su, supporting cell; se, sensory cell; arrows indicate hair bundles. (B) Higher-magnification view of the left boxed area in (A). Scale bar, 0.1 μm . (C) Higher-magnification view of the right boxed area in (A). Scale bar, 0.1 μm . Immunolabeled gold (10 nm, arrowheads) was diffusely seen in the intracellular region of the sensory cells and supporting cells of the saccule. There was the impression that the number of immunogold Aqp6 labelings in the supporting cells was more than that in the sensory cells. Immunolabeled gold was also observed on the membrane of intracellular vesicles (asterisk), but absent in the plasma membrane.

is perhaps different in the rat and human. These areas are thought to be the main sites of the secretion and absorption of endolymph. Therefore, Aqp6 might play some role in the homeostasis of endolymph in the inner ear. It has been reported that the dark cells of the frog semicircular canal are involved in the endolymph secretion [19]. In this study, Aqp6 protein was localized in the sensory epithelium of the cupula. Although the cupula is thought to be one of the sites that produces endolymph, the expression of Aqp6 was not greatly different from the other sites. In the utricle and the saccule, there was the impression that the number of immunogold Aqp6 labelings in the supporting cells was more than that in the sensory cells. This result indicates that the activity of the supporting cells in the utricle and the saccule could be higher than that of the sensory cells. Furthermore, it appeared that the Aqp6 protein was located in the membrane of intracellular vesicles of these areas from the results of immunoelectron microscopic studies. Therefore, Aqp6 might be involved in some distinct physiological function of acid-base metabolism and water balance in endolymphatic fluid homeostasis. However, only a few immunogold Aqp6 labelings were observed in the apical site of the marginal cells, and Aqp6 labeling was not present in the plasma membrane. This result implies that Aqp6 could not take a direct role in water flux via the plasma membrane.

Recently, two different spliced variants of mAqp6 (mAqp6a and mAqp6b) were identified in the mouse kidney. The mAqp6a isoform is almost identical to rat Aqp6, whereas mAqp6b is identical to the isoform reported in the mouse cerebellum library [20]. Although it is not known whether the same variants exist in the inner ear, Aqp6 might have complicated functions mediated by these isoforms. Further elucidation of Aqp6 function will provide fundamental and novel insights into the inner fluid homeostasis system.

Acknowledgements

This study was supported by a Health and Labor Science Research Grant in Japan [Research on Measures for Intractable Disease (Vestibular Disorders)] and a Grant-in-Aid for Scientific Research C(2)(17591792) provided by the Ministry of Education, Science and Culture.

References

- [1] Sawada S, Takeda T, Kitano H, Takeuchi S, Okada T, Ando M, et al. Aquaporin-1 (AQP1) is expressed in the stria vascularis of rat cochlea. *Hear Res* 2003;181:15-9.

- [2] Sawada S, Takeda T, Kitano H, Takeuchi S, Kakigi A, Azuma H. Aquaporin-2 regulation by vasopressin in the rat inner ear. *NeuroReport* 2002;13:1127-9.
- [3] Kumagami H, Loewenheim H, Beitz E, Wild K, Schwartz H, Yamashita K, et al. The effect of anti-diuretic hormone on the endolymphatic sac of the inner ear. *Pflugers Arch* 1998; 436:970-5.
- [4] Beitz E, Kumagami H, Krippeit-Drews P, Ruppertsberg JP, Schultz JE. Expression pattern of aquaporin water channels in the inner ear of the rat: the molecular basis for a water regulation system in the endolymphatic sac. *Hear Res* 1999; 132:76-84.
- [5] Huang D, Chen P, Chen S, Nagura M, Lim DJ, Lin X. Expression patterns of aquaporins in the inner ear: evidence for concerted actions of multiple types of aquaporins to facilitate water transport in the cochlea. *Hear Res* 2002;165: 85-95.
- [6] Couloigner V, Berrebi D, Teixeira M, Paris R, Florentin A, Bozorg Grayeli A, et al. Aquaporin-2 in the human endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 2004;124:449-53.
- [7] Loewenheim H, Hirt B. Aquaporine: discovery, function, and significance for otorhinolaryngology. *HNO* 2004;52:673-8.
- [8] Fukushima K, Takeda T, Kakigi A, Takeda S, Sawada S, Nishioka R, et al. Effects of lithium on endolymph homeostasis and experimentally induced endolymphatic hydrops. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2005;67:282-8.
- [9] Fukushima M, Kitahara T, Uno Y, Fuse Y, Doi K, Kubo T. Effects of intratympanic injection of steroids on changes in rat inner ear aquaporin expression. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 2002;122:600-6.
- [10] Takeda T, Takeda S, Kitano H, Okada T, Kakigi A. Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hear Res* 2000;140:1-6.
- [11] Takeda T, Sawada S, Takeda S, Kitano H, Suzuki M, Kakigi A, et al. The effects of V₂-antagonist (OPC-31260) on endolymphatic hydrops. *Hear Res* 2003;182:9-18.
- [12] Yasui M, Know TH, Knepper MA, Nielsen S, Agre P. Aquaporin-6: an intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5808-13.
- [13] Ikeda M, Beitz E, Kozono D, Guggino WB, Agre P, Yasui M. Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells. *J Biol Chem* 2002;277:39873-9.
- [14] Lopez IA, Ishiyama G, Lee M, Baloh RW, Ishiyama A. Immunohistochemical localization of aquaporins in the human inner ear. *Cell Tissue Res* 2007;328:453-60.
- [15] King LS, Kozono D, Agre P. From structure to disease: the evolving of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5:687-98.
- [16] Castle NA. Aquaporins as targets for drug discovery. *Drug Discovery Today* 2005;10:485-93.
- [17] Ohshiro K, Yaoita E, Yoshida Y, Fujinaka Y, Matsuki A, Kamiie J, et al. Expression and immunolocalization of AQP6 in intercalated cells of the rats kidney collecting duct. *Arch Histol Cytol* 2001;64:329-38.
- [18] Holm LM, Klaerke DA, Zeuthen T. Aquaporin 6 is permeable to glycerol and urea. *Pflugers Arch* 2004;448:181-6.
- [19] Ferrary E, Bernard C, Oudar O, Sterkers O, Amiel C. Secretion of endolymph by the isolated frog semicircular canal. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1992;112:294-8.
- [20] Nagase H, Agren J, Saito A, Liu K, Agren P, Hazama A, et al. Molecular cloning and characterization of mouse aquaporin 6. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;352:12-6.

1. COCH 遺伝子とめまい

池園 哲郎

COCH gene and Vertigo

Tetsuo Ikezono

Department of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School

We have performed a proteomic analysis of the inner ear proteins using 2D-GE. In the process of analysis, we have found very unique properties of the *COCH* gene product. The *COCH* gene mutated in DFNA9, an autosomal dominant hereditary sensorineural hearing loss and vestibular disorder, encodes cochlin. DFNA9 patients show symptoms such as episodes of vertigo, tinnitus, aural fullness and hearing loss. Clinically, these symptoms are consistent with the criteria for Meniere's disease. *COCH* is the only gene identified so far whose mutation leads to the symptoms of Meniere's disease in a significant portion of the carriers.

We showed that Cochlin constitutes 70% of inner ear proteins, and identified three cochlin isoforms in the inner ear tissue, p63s, p44s and p40s, which exhibit significant molecular heterogeneity. Structure analysis of Cochlin isoforms showed that the mutations influence only the full-length isoform of Cochlin (p63s), and not the processed Cochlin isoforms (p44s and p40s), which do not contain the LCCL domain. What happens to the LCCL domain once it is cleaved from full-length Cochlin was an open issue.

We further characterized the expression and structure of Cochlin isoforms by isoform-specific antibodies that recognize three distinct domains. Inner ear, as well as perilymph proteins were analyzed by western blot analysis. We have detected Cochlin isoforms in the inner ear tissue and we have identified a novel short 16 kDa isoform in the perilymph, named Cochlin-tomoprotein (CTP), corresponding to the N-terminus of full-length Cochlin (p63s) and the LCCL domain. Notably, CTP contains all of the known mutation sites associated with DFNA9. Our results on the formation and processing of these isoforms in the inner ear will be central to a better understanding of Cochlin function and its role in the pathophysiology of DFNA9.

Furthermore, using above mentioned results, we are now performing a translational research to improve diagnosis and prognosis in patients with sensorineural hearing loss and vestibular disorders.

Key words: proteomic analysis, DFNA9, *COCH* gene, Cochlin isoform, CTP, translational research

目 次

1. COCH 遺伝子とは
2. われわれの研究の結果からわかった COCH 遺伝子と Cochlin の特徴
3. DFNA9 におけるめまい・難聴発症のメカニズム
4. COCH 遺伝子研究のめまい疾患研究への臨床応用
—内耳自己免疫疾患と外リンパ瘻—
5. おわりに

1. COCH 遺伝子とは

1) DFNA9 と Cochlin について

1991年に常染色体優性遺伝性難聴を呈する家系の内耳病理所見が Khetarpal ら¹⁾により報告されており、これが現在 DFNA9 と呼ばれる遺伝性難聴である。Robertson ら²⁾は subtraction hybridization という手法を用いて、脳と比較してより内耳に特異的に発現する遺伝子、COCH (コークまたはコーシュ) 遺伝子を同定した。COCH は12のエキソンから成り、クロモソーム14 (14q12-q13) に存在している。この遺伝子は、その後1998年に DFNA9 の原因遺伝子であることが判明した³⁾。この遺伝子を作る蛋白は Cochlin (コクリン) と命名されている (通常ある遺伝子の蛋白産物には -lin が語尾に付けられる)。Cochlin は内耳の細胞外マトリックス蛋白であることはわかっているが、その機能はまだ不明である。

DFNA9 は臨床所見, ヒト病理所見, 原因遺伝子, 蛋白解析が揃って報告されている数少ない遺伝性難聴の一つである。

①その臨床像は、常染色体優性非症候性遺伝性難聴で35~55歳 (平均すると40歳頃) に発症す

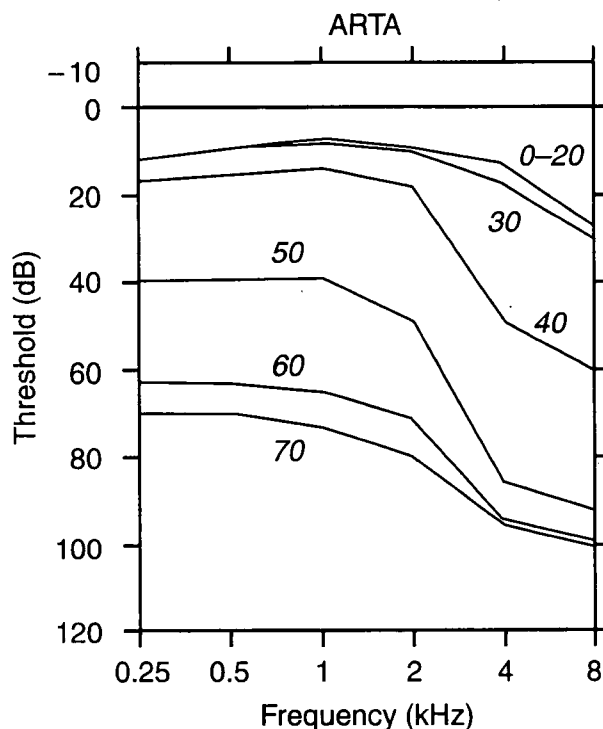


図1 ARTA (age related typical audiogram) of DFNA9

る。両側性進行性難聴 (高音障害型) と前庭機能障害が特徴である。

②高音が障害され徐々に中、低音域にも及ぶ感音難聴を呈する⁴⁾ (図1) (ARTA: age related typical audiogram 参照)。

③ベルギー, オランダ, アメリカ, 日本⁵⁾, オーストラリア, ハンガリーで報告され、今まで6箇所の突然変異部位が報告されている (表1)。興味深いことに、homozygous の患者では、より若い25歳で発症し、heterozygous の患者と比較して難聴の進行が速い⁴⁾。

④前庭系の症状は、暗所で著明になる平衡障害, 動揺病, 歩行時のふらつき, 頭位性めまいで

表1 DFNA9 Mutations

Family	mutation	genotype
3 American families	1 missense mutation	V66G
	1 missense mutation	G88E
	1 missense mutation	W117R
15 Dutch/Belgian	1 missense mutation	P51S
1 Australian	1 missense mutation	I109N
1 Japanese	1 missense mutation	A119T
1 Hungarian	1 deletion mutation	V104

ある。Verhagen⁶⁾らは患者の神経耳科学的検査を行い報告した。検査項目は急速眼球運動検査, 追跡視運動検査 (ET), 水平性 OKN, 頸性眼反射 (頭部を固定し体幹を回転), 回転後眼振検査, カロリックテストである。眼球運動系の検査には異常なく, 頸性眼反射も正常であった。末梢前庭機能は難聴発症と同時期に低下し始めて徐々に進行し60歳以後に無反応になることが多い。病態の進行にはかなりの個人差がみられ, 40歳台で無反応になる症例もある。ベルギーとオランダの大家系の調査では P51S 変異をもつ DFNA9 患者の25%に AAO-HNS のメニエール病診断基準に合致する症状 (反復性の20分以上持続する回転性めまいに耳閉感, 難聴, 耳鳴りを伴う) がみられたことから家族性メニエール病の原因遺伝子として注目された⁷⁾。その後一般のメニエール病症例の COCH 遺伝子変異も検索されたが結果は陰性であった。

ヒト病理所見⁸⁾では, 蝸牛, 前庭の広い範囲に変異蛋白 (ムコ多糖蛋白) の沈着が特徴的である。蝸牛では, ラセン隆起を含む螺旋靱帯, ラセン板縁, 基底板に著名な好酸性物質の沈着がある。コルチ器の変化は症例により程度の差があり内外

有毛細胞は部分的に消失している。ラセン神経節細胞は部分的に変性しており, この変化は基底回転ほど強い。血管条はほとんど正常に保たれているが, 軽度の萎縮がある。前庭では, 全ての平衡斑と膨大部稜の間質は著名に変性しており, 有毛細胞はほぼ完全に消失, 膜迷路 (膜半規管) と外リンパの trabecular mesh の肥厚, 球形囊耳石膜の変性がみられる。

2) Cochlin のモチーフ解析

COCH 遺伝子の機能ははまだ解明されていない。分子生物学では, そのアミノ酸配列のモチーフ解析から蛋白機能の手がかりを探るという手法が取られている。COCH 遺伝子には3つのモチーフが存在する (図2)。

(1) Signal sequence

分泌性の蛋白によくみられる配列で, その蛋白が細胞内外のどの部位に行くべきか, 指令していると考えられている。

(2) LCCL module

2000年にハンガリーのグループにより命名された新しいモチーフ⁹⁾である。下記の3つの遺伝子にもこのモチーフが含まれており, その頭文字をとり LCCL と命名された。このモチーフが担う

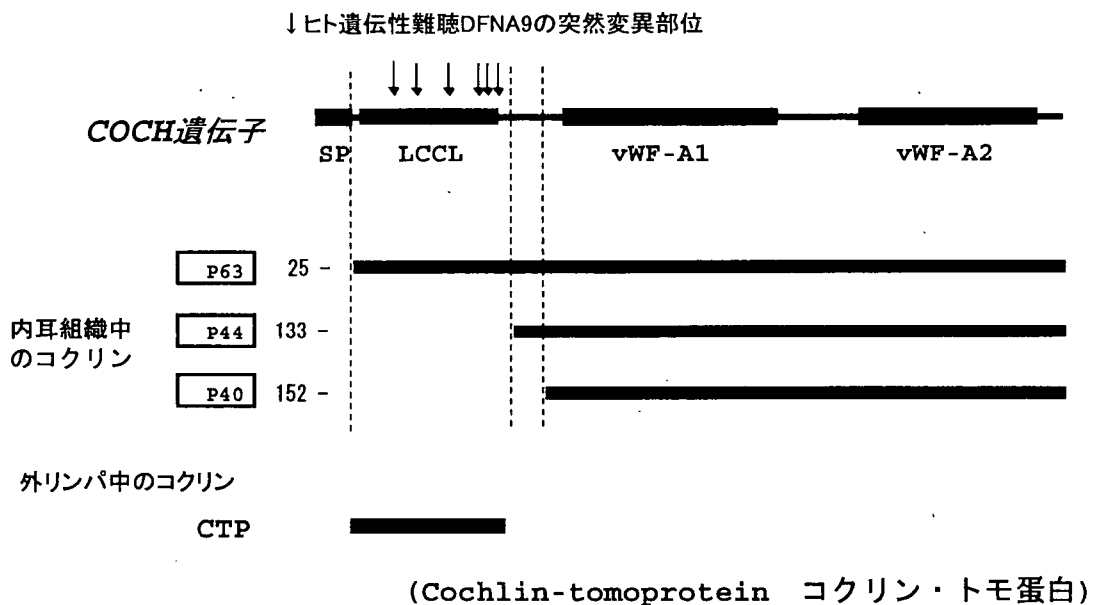


図2 COCH 遺伝子と Cochlin 蛋白のアイソフォーム構造模式図

ヒト COCH 遺伝子, Cochlin, ならびに今まで報告されているヒト DFNA9 の突然変異部位を示す。内耳組織中にはアイソフォーム p63, p44, p40 が発現しており, 外リンパ中には CTP が発現している。突然変異は全て p63 アイソフォームの N 末端にのみ含まれており, そのほかのアイソフォームには含まれていなかった。

機能はまだ不明であるが COCH 遺伝子の機能解明の鍵を握ると言われている。

- ① Limulus factor C : カプトガニの自然免疫能, 血液凝固
- ② COCH : 聴覚, 平衡。
- ③ LGL1 : ラットの肺の発生に関与。
- (3) vWF (フォンビルブランド因子) type A domain

下記に示すような多様な蛋白にみられるモチーフである。

① 分泌性蛋白 (可溶性, 非可溶性) : 止血系 (vWF), 補体系 (C2, factorB), 免疫系 (LFA-1, MAC-1etc) など。

② Extracellular matrix (CMP, Collagen 6. 7. 12. 14)。

このモチーフには fibrillar collagens, glycoprotein, proteoglycans への結合作用があることが知られている。

モチーフ解析の結果と, 後述する Cochlin・アイソフォーム解析の結果から C 末端の vWF type A domain がコラーゲンに結合し, N 末端の LCCL module が何らかの重要な機能を担っているのではないかと推測している。

2. われわれの研究の結果からわかった COCH 遺伝子と Cochlin の特徴

COCH 遺伝子に関する研究を3つのステップに分けて解説する。

われわれは, 内耳に発現する蛋白を網羅的に解析する目的で研究その1 (ウシ内耳蛋白の二次元電気泳動解析) を行った。その結果, Cochlin に関して非常に興味深い結果が得られたため, さらに研究を進展させて研究その2 (Cochlin・アイソフォーム特異的抗体によるヒト内耳蛋白の解析) と研究その3 (ヒト外リンパの解析による新たなアイソフォームの同定) を行った。

研究その1 : ウシ内耳蛋白の二次元電気泳動解析¹⁰⁾

本誌¹¹⁾ にすでに報告したので簡潔に記す。

1) 方法

内耳組織の二次元電気泳動ならびに各蛋白スポットの同定を行った。通常の蛋白電気泳動は SDS 変性下の平板ゲル電気泳動である。これに対し二次元電気泳動では, 先ず蛋白の等電点に基づいて泳動し, それを平板ゲルの上に載せてさらに分子

量に基づき泳動し蛋白を2次元平面に泳動展開する (図3a)。

さらに各蛋白スポットを切り出して, そのN末端アミノ酸配列は492 cLC pulse-liquid phase protein sequencer (Applied Biosystems) を用いて解読する。その結果を遺伝子・蛋白データベースを用いて解析し同定する。

2) 結果と考察

本来プロテオーム解析とは, 当該臓器の全蛋白を二次元電気泳動マッピングした「基本地図」を作成し, 健康な状態と病的状態, 発生過程, 刺激と非刺激状態などの蛋白発現を網羅的に比較することによって, 蛋白発現レベルの変化や細胞間相互作用などを解明することを目的としている。今回われわれはウシ内耳蛋白の「二次元電気泳動マッピング」を行った結果, 画像解析ソフトで認識された135個のうち, 89個のスポットを解析・同定した (未発表)。

マッピングの過程で Cochlin に関して非常にユニークな知見を得た。その結果を箇条書きにすると, 以下のようになる (表2, 図2, 3)。

① Cochlin は3つの異なったN末端をもち, 分子量がそれぞれ63 kDa, 44 kDa, 40 kDa の3種類のアイソフォーム p63s, p44s, p40s に分類される。

② Cochlin・アイソフォームはさらに等電点が異なる合計で16個の蛋白から構成されている。

③ Cochlin は内耳の構成蛋白の70%を占める (コラーゲンは本泳動条件では検出されないため, 非コラーゲン構成蛋白という条件付きである)。

④ DFNA9 患者にみられる突然変異部位は全て p63s にのみ含まれており, p44s, p40s には含まれていなかった。

⑤ さらに, この突然変異部位は COCH 遺伝子の LCCL 領域のみにあり, この LCCL 領域が COCH 遺伝子の機能に重要な部分であることが予測される。

研究その2 : Cochlin・アイソフォーム特異的抗体によるヒト内耳蛋白の解析¹²⁾

1) 方法

(1) 抗 Cochlin・アイソフォーム特異的抗体の作成

① 抗原のデザイン

二次元電気泳動解析で同定した Cochlin・アイ

表2 Cochlin N 末端のアミノ酸配列解析結果

今回の実験で得られたウシ・Cochlin の N 末端アミノ酸配列を、既知のヒト、マウス、チキンの cDNA から類推されるアミノ酸配列と比較した。左から、アイソフォームのナンバー、種、配列、ヒト COCH 遺伝子のアミノ酸に相当する部位、ウシアミノ酸配列とそれぞれの種のアミノ酸との相同性を表示してある。内部配列も合わせると全体でヒト COCH 遺伝子と89.3%という非常に高い相同性が得られ、これらの蛋白スポットはヒト・Cochlin ホモログであることが示された。

protein		sequence	position in hCOCH	sequence identity
p63-1 to 8	human	EGAAPIAITCFTRGLDIRKEKADVLCPPG	25-53	83%
	bovine	---V--P---*S-----*---		—
	mouse	---V--PV-----		86%
	chiken	DSS-SN-----L---TE----AN		48%
p44-1 to 5	human	ATGQAVSTAHPPTGKRLKKTPE	133-154	95%
	bovine	-----A-----		—
	mouse	---R-----S-----		86%
	chiken	-V-RS-A--R-A---P---L-		68%
p40-1 to 3	human	TPEKKTGNKDKADIAFLIDGSFNIGQRRF	152-181	97%
	bovine	-----*-----		—
	mouse	-----		97%
	chiken	-L---A-----Y-----		87%

ソフォームに特異的な抗体を4種類作成した。抗体を作成する際に、より免疫原性の高いエピトープをコンピューターで予測するソフトが開発されており、今回は Epitope Advisor Program (富士通九州システムエンジニアリング) を用いた。抗原ポリペプチドとして14から19アミノ酸より成るポリペプチドを選択した。通常のポリクローナル抗体作成法を行い、アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて抗体を精製した。

抗原として用いたペプチドとその抗体の名称とその特徴 (図4) は、

#1; "anti-LCCL-N" 全長 Cochlin p63 の LCCL domain の N 末端に該当。

#2; "anti-LCCL-C" 全長 Cochlin p63 の LCCL domain の C 末端に該当し、アイソフォーム p44s には含まれない部分。

#3; "anti-ivd1" LCCL domain と vWF-A1 domain の間に該当し、アイソフォーム p44s には含まれるがアイソフォーム p40s には含まれない。

#4; "anti-vWF-A1" vWF-A1 domain の中にあり、p63s, p44s, p40s 全てに含まれる。

②一次元ウェスタンブロッティング、抗体反応、検出反応

通常的一次元ウェスタンブロッティングを行い

PVDF membrane に蛋白をプロットした。次に、上記抗 Cochlin・アイソフォーム特異的抗体4種類を1次抗体として反応させ化学発光法による検出および解析を行った。

検討対象組織には聴神経腫瘍手術時に採取したヒトの内耳組織を用いた。抗体の特異性の確認はペプチド・ドットプロットならびにウシの内耳組織より調製した内耳蛋白質溶液 (陽性コントロール) を抗原としたウェスタンブロッティングにより行った。

2) 結果と考察

すでに報告したウシ内耳 Cochlin・アイソフォーム解析結果と全く同様にヒト内耳組織中にも p63s, p44s, p40s が認められた (図5a)。ほかに、ウシ、ラット、モルモットでも検討したが、アイソフォーム発現パターンは全て同じであった。この結果は、ほ乳類では Cochlin・アイソフォームのプロセッシングが保存されていることを示している。遺伝子によっては、動物種によって異なった発現パターンを示すものもあるが、Cochlin の発現に関する限り、齧歯類内耳を用いた研究を行うことが可能であることを示す。

研究その3: ヒト外リンパの解析による新たなアイソフォームの同定¹²⁾

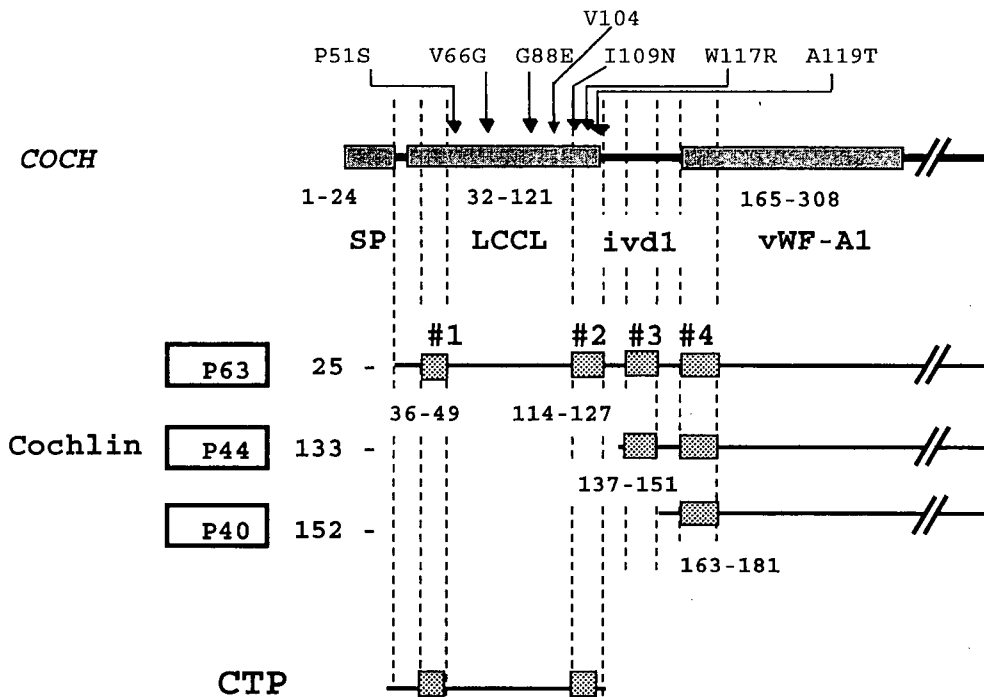


図4 Cochlin・アイソフォーム特異的抗体作成用の抗原ペプチド
#1～4は、アイソフォームを特異的に認識するようにデザインされた抗原ペプチドの位置を示す。

1) 方法

上記抗体を用いてヒト、ウシの外リンパを一次元、二次元ウェスタンブロッティングで解析した。

2) 結果と考察

ヒト外リンパでは、約 16 kDa に明瞭な細目のバンドが検出され、これはその分子量ならびに抗 Cochlin N 末端・C 末端抗体両方で全く同じパターンで認識されていることから Cochlin-Tomoprotein (CTP) (コクリン-トモ蛋白) と考えられた (全長 Cochlin p63s の N 末端が切り取られた N 末端フラグメント蛋白という意味を込めて、tomo- という接頭辞を付けた) (図2, 5b)。

ウシ外リンパでは 16 kDa よりやや分子量の大きい幅の広いバンド (17～23 kDa) が検出され、種により CTP の発現には微妙な差異があることを示している。

CTP は、おそらく LCCL module そのものであることが推察される。LCCL module そのものが独立した蛋白として存在する例はほかには知られておらず、生物学的にも非常に興味深い分子である。今後、CTP の機能が判明すれば Cochlin の機能を推察するうえでも非常に役立つであろうと

考えられる。また、CTP は非症候性優性遺伝性難聴 DFNA9 の突然変異部位全てを含んでおり、DFNA9 発症メカニズムを解明するうえでも重要な蛋白である。これらの観点から現在われわれは COCH 遺伝子発見者である Robertson 博士と共同研究を行っている。

COCH 遺伝子は、①難聴、めまい両方に関与することが明らかになっている、②その発現量が内耳で非常に多い、③ Cochlin には等電点、分子量の heterogeneity がみられる、④ Cochlin のアイソフォームは外リンパに分泌されている、といった特徴をもっており、内耳の生理機能、病態解析に重要な遺伝子であることが強く示唆される。

3. DFNA9 におけるめまい・難聴発症のメカニズム

DFNA9 における機能障害の発症機序分子生物学的に dominant negative effect (優性ネガティブ効果) という言葉で説明されている。それは、「ヘテロ接合体において突然変異遺伝子産物がそれ自体の機能を喪失するだけでなく、正常対立遺伝子産物の機能を妨げること」を意味している。変異蛋白 (ムコ多糖蛋白) が内耳に沈着して機能を妨

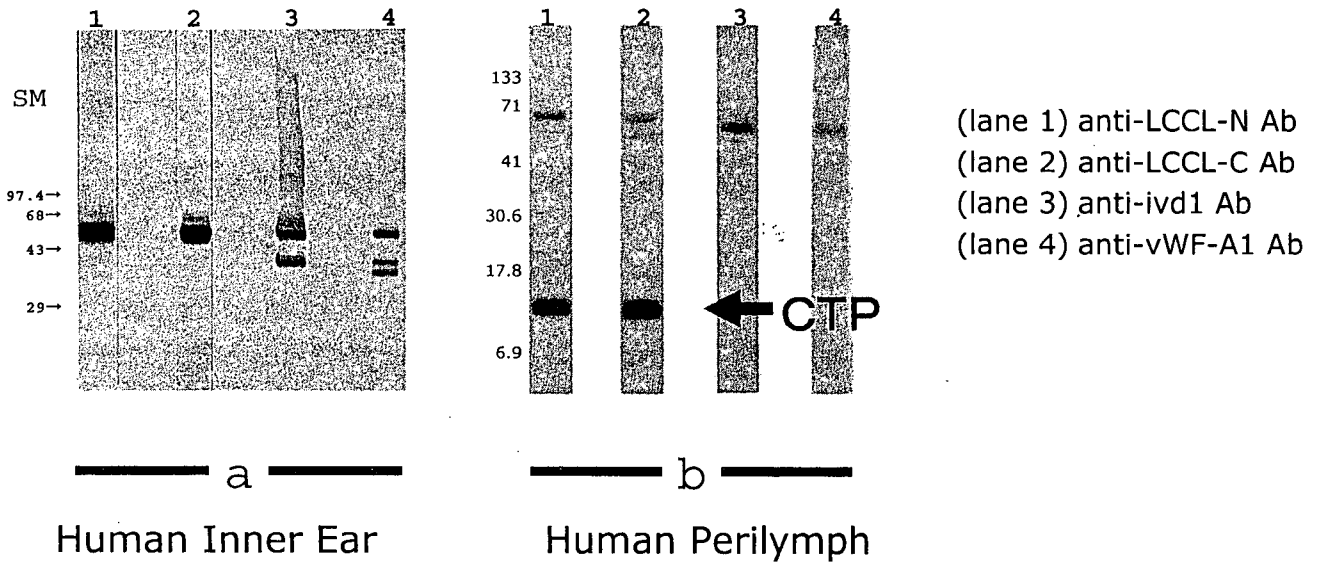


図5 ヒト内耳 (a), 外リンパ (b) の Cochlin・アイソフォーム

ヒト内耳 (a), 外リンパ (b) を泳動したプロットを短冊状に切り、4種類の抗体で染色した結果を示す。(a) ヒト内耳では、ウシと全く同様に3種類のアイソフォーム p63, p44, p40 が発現していることがわかる。(b) ヒト外リンパでは、極少量の p63 と、16 kDa の CTP が検出された。(a), (b) の泳動結果は、図2で示した Cochlin・アイソフォームの模式図をもとに予測した通りの結果であり、予測されないバンドは検出されなかった。つまり、われわれが提唱している Cochlin・アイソフォームの構造が正しいことを裏づけている。

げる、もしくは変異蛋白が周囲の組織の蛋白と異常な反応を起こして異常蛋白を作る結果、神経、感覚細胞の変性をきたす、というプロセスが推察されている。

この仮説を検証するために、培養細胞を用いた *in vitro* の実験が行われた。分子生物学では、セルラインに遺伝子を導入・リコンビナント蛋白を発現させてその解析をするという手法がよく用いられる。Grabski ら¹³⁾ (Cell Biology, アラバマ大学) は子宮癌細胞セルライン HeLa cells (約50年前に子宮癌で亡くなったアメリカ人, Henrietta Lacks さん由来細胞) を用いて、Robertson ら¹⁴⁾ (Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology, Harvard 大学) は、293T (human embryonic kidney cells) を用いた。その結果、それぞれ細胞内には 63 kDa, 60 kDa の1種類の蛋白のみしか検出されなかった。さらに遺伝子導入細胞 lysate のみならず、その培養液の免疫沈降反応を行いかなり詳細に検討している。その結果得られた Cochlin 様蛋白は、それぞれ 60, 50 kDa と 69 kDa であった (表3)。つまり、われわれがウシやヒトの内耳組織、外リンパを用いて解析した結果とは大いに異なる結果であった。この事実は Coch-

lin の転写後調節、蛋白レベルでのプロセッシングは内耳細胞特異的であることを示唆している。この「非内耳細胞」での実験ではあるが、彼らはさらに DFNA9 でみられる変異遺伝子を導入した。

表3 一次元電気泳動による Cochlin・アイソフォーム解析

は乳類培養細胞 (HeLa cell, 293T cell) に COCH 遺伝子を導入した実験では、細胞内には60, 63 kDa の蛋白が検出された。培養液中には60, 50ならびに 69 kDa の蛋白が検出された。一方、ヒト、ウシの内耳組織には、p63, p44, p40 アイソフォームが存在している。外リンパには、p63 と CTP (16 kDa) が発現していた。この結果は、Cochlin・アイソフォームの発現調節は、内耳細胞特異的であることを示している。

使用した細胞	Cell lysates	Culture media
HeLa cell (13)	60	60 50
293T cell (14)	63	69
使用した種	内耳組織	perilymph
ヒト (12)	63 44 40	63 16
ウシ (12)	63 44 40	63 16

(文献番号)

*単位は kDa

変異遺伝子産物は蛋白の高次構造が乱れ内耳組織に異常蛋白が蓄積する¹⁵⁾、このため変異蛋白は電気泳動結果に差が出るだろう、という仮説のもとに行われた実験であった。しかし結果は予想に反して、正常蛋白と変異蛋白に電気泳動度に差がなかった。

現在は遺伝子工学テクニックを応用したマウスの実験が進行中である。米国 NIH の Colin Stewart 博士のグループは、胎児の着床に Cochlin が関与していることを見だし、COCH 遺伝子ノックアウトマウスを作成した。このマウスの ABR 反応閾値は生後3ヵ月間正常という驚くべき結果が報告された¹⁶⁾。このノックアウトマウスは vWF-type A domain のみをノックアウトしており、COCH 遺伝子の一番重要な機能を担う LCCL ドメインは微量ながらも発現していると考えられる。つまり、LCCL ドメインの発現があれば Cochlin の本来の機能は保たれ vWF-type A domain を欠如した変異 Cochlin の機能はほかの細胞外マトリックス蛋白により補完されている可能性がある。さらに DFNA9 患者にみられる変異を“ノックイン”させたマウスも新たに作成されており近々その結果が発表されることが期待される¹⁷⁾。

4. COCH 遺伝子研究のめまい疾患研究への臨床応用

—内耳自己免疫疾患と外リンパ瘻—

基礎医学研究の目標は、研究成果を実地臨床現場に応用し患者の利益となるべく役立てることにある。Cochlin は遺伝性難聴の原因遺伝子であり、その研究は将来的に遺伝性難聴の診断・治療に結びつく。近年人工内耳術後の成績予測に難聴遺伝子変異解析が用いられつつあり¹⁸⁾、高度難聴となった DFNA9 患者の人工内耳による治療成績は良好であることが知られている。また Cochlin の内耳発現特異性を利用した遺伝子治療法の開発の可能性もある¹⁹⁾。

現在われわれは Cochlin の「発現特異性」を応用した下記の臨床応用研究を進めている。

1) 自己免疫性難聴の診断

自己免疫性内耳性難聴（急速進行性両側進行性感音難聴）は北米ではすでに免疫抑制剤の大規模コントロールスタディー²⁰⁾が行われるなど認知度が非常に高い疾患である。内耳自己抗原は今まで HSP70 が有力視されてきた。しかし最近

HSP70 は内耳に炎症を起こす原因となるいわゆる“起炎性自己抗原”ではないとされており、確定診断に有効な検査法はまだ確立していないのが現状である。Cochlin は内耳特異的に多量に発現しておりしかも内耳特異性の高い発現をしていることから、自己免疫性内耳性難聴²¹⁾の自己抗原である可能性がある。ごく最近、細胞性免疫の観点から Cochlin が自己抗原であることを示唆する報告がなされた²²⁾。現在われわれは、2次元電気泳動ウェスタンブロットやリンパ球刺激試験などを用いて、実際の症例の免疫異常を検出する研究を行っている。

2) 外リンパ瘻診断

アイソフォーム解析の結果、蛋白レベルでは全長 Cochlin p63 の発現は、内耳特異的であることが判明した²³⁾。そこで、さらに CTP の発現を調べてみた。人工内耳、アブミ骨手術、半規管瘻孔の術中に漏出したヒト外リンパを検査したところ、全検体が明らかに CTP 陽性だった。一方、中耳に存在し得る他の体液、つまり髄液、血液、中耳洗浄液、慢性中耳炎の耳漏、滲出性中耳炎の滲出液を検査したところ、これらは全例陰性であった。この結果は、CTP が外リンパ瘻診断の生化学的マーカーとして十分な発現特異性を兼ね備えていることを示している。

現在われわれは、CTP の外リンパ発現特異性を利用して、「外リンパ瘻診断」に応用する研究を行い、臨床検査センターとの共同研究を進めている²⁴⁾。

5. おわりに

分子生物学の技術的進歩に伴い数多くの病因遺伝子が同定され、未知の遺伝子も新たに発見され、内耳疾患の研究は爆発的に進歩している。腫瘍などの特別な場合を除き、通常の内耳疾患ではバイオプシーは禁忌である。生体病理所見が得にくい内耳疾患の病態に、分子生物学的アプローチが新たな展望を開くことが期待される。

文 献

- 1) Khetarpal U, Schuknecht HF, Gacek RR, et al: Autosomal dominant sensorineural hearing loss. Pedigrees, audiologic findings, and temporal bone findings in two kindreds. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 117: 1032-1042, 1991
- 2) Robertson NG, Khetarpal U, Gutierrez-Espeleta

- GA, et al: Isolation of novel and known genes from a human fetal cochlear cDNA library using subtractive hybridization and differential screening. *Genomics* 23: 42-50, 1994
- 3) Robertson NG, Lu L, Heller S, et al: Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat Genet* 20: 299-303, 1998
 - 4) Kemperman MH, Bom SJ, Lemaire FX, et al: DFNA9/COCH and its phenotype. *Adv Otorhinolaryngol* 61: 66-72, 2002
 - 5) Usami S, Takahashi K, Yuge I, et al: Mutations in the COCH gene are a frequent cause of autosomal dominant progressive cochleo-vestibular dysfunction, but not of Meniere's disease. *Eur J Hum Genet* 11: 744-748, 2003
 - 6) Verhagen WI, Bom SJ, Fransen E, et al: Hereditary cochleovestibular dysfunction due to a COCH gene mutation (DFNA9): a follow-up study of a family. *Clin Otolaryngol* 26: 477-483, 2001
 - 7) Fransen E, Verstreken M, Verhagen WI, et al: High prevalence of symptoms of Meniere's disease in three families with a mutation in the COCH gene. *Hum Mol Genet* 8: 1425-1429, 1999
 - 8) Merchant SN, Linthicum FH, Nadol JB Jr: Histopathology of the inner ear in DFNA9. *Adv Otorhinolaryngol* 56: 212-217, 2000
 - 9) Trexler M, Banyai L, Datthy L: The LCCL module. *Eur J Biochem* 267: 5751-5757, 2000
 - 10) Ikezono T, Omori A, Ichinose S, et al: Identification of the protein product of the Coch gene (hereditary deafness gene) as the major component of bovine inner ear protein. *Biochim Biophys Acta* 1535: 258-265, 2001
 - 11) 池園哲郎: めまい・難聴遺伝子 COCH のプロテオーム解析. *Equilibrium Res* 61: 47-53, 2002
 - 12) Ikezono T, Shindo S, Li L, et al: Identification of a novel Cochlin isoform in the perilymph: insights to Cochlin function and the pathogenesis of DFNA9. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 440-446, 2004
 - 13) Grabski R, Szul T, Sasaki T, et al: Mutations in COCH that result in non-syndromic autosomal dominant deafness (DFNA9) affect matrix deposition of cochlin. *Hum Genet* 113: 406-416, 2003
 - 14) Robertson NG, Hamaker SA, Patriub V, et al: Subcellular localisation, secretion, and post-translational processing of normal cochlin, and of mutants causing the sensorineural deafness and vestibular disorder, DFNA9. *J Med Genet* 40: 479-486, 2003
 - 15) Liepinsh E, Trexler M, Kaikkonen A, et al: NMR structure of the LCCL domain and implications for DFNA9 deafness disorder. *EMBO J* 20: 5347-5353, 2001
 - 16) Makishima T, Rodriguez CI, Robertson NG, et al: Auditory function and Development studies of COCH transgenic mice. 5th Molecular Biology of hearing and Deafness (BETHESDA MD, USA, 2004.9.30-10.3) ABSTRACT p 47
 - 17) Robertson NG, Sivakumaran TA, Hamaker SA, et al: Development of a COCH "knock in" mouse model for DFNA9. 5th Molecular Biology of hearing and Deafness (BETHESDA MD, USA, 2004.9.30-10.3) ABSTRACT. p 123
 - 18) Fukushima K, Sugata K, Kasai N, et al: Better speech performance in cochlear implant patients with GJB2-related deafness. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 62: 151-157, 2002
 - 19) 池園哲郎: メニエール病と遺伝子治療. *Equilibrium Res* 62: 112-116, 2003
 - 20) Harris JP, Weisman MH, Derebery JM, et al: Treatment of corticosteroid-responsive autoimmune inner ear disease with methotrexate: a randomized controlled trial. *JAMA* 290: 1875-1883, 2003
 - 21) 八木聡明, 池園哲郎, 新藤 晋, 他: 2次元電気泳動法による内耳自己抗原の検索. 厚生労働省特定疾患対策研究事業前庭機能異常に関する調査研究班, 平成12年度報告書. 39-41頁, 2000
 - 22) Solares CA, Edling AE, Johnson JM, et al: Murine autoimmune hearing loss mediated by CD4+T cells specific for inner ear peptides. *J*

Clin Invest 113: 1210-1217, 2004

- 23) Expression of full-length Cochlin p63s is inner ear specific. *Auris Nasus Larynx* (accepted)
- 24) 池園哲郎, 新藤 晋, 李 麗淑, 他: 外リンパ瘻の新たな生化学的確定診断法 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 前庭機能異常に関する調査研究班, 平成15年

度報告書. 59-62頁, 2003

原稿到着: 平成16年11月10日

別刷請求先: 池園哲郎

〒113-8603 東京都文京区千駄木1-1-5

日本医科大学耳鼻咽喉科

外リンパ瘻の診断マーカーとしての Cochlin-Tomoprotein(CTP)

KEYWORDS

外リンパ瘻, 診断マーカー, Cochlin CTP

1. 外リンパ瘻とは

「外リンパ瘻」は耳鼻咽喉科診療以外ではあまり知られていない病名で難聴, 耳鳴り, めまい, 平衡障害など様々な症状を呈する疾患である。外リンパ瘻は外傷性難聴, 内耳梅毒, ウイルス(ムンプスやVZV)性難聴, 薬剤性難聴などと同様に発症原因に基づく診断名である。内耳疾患の病名で一般的によく知られているのは, 突発性難聴, メニエール病などであるが, これらは症候学的診断名であり, 特発性であることがその診断基準に明記されている。これらの症例の中に外リンパ瘻が少なからず含まれていることが以前より指摘されており本稿で述べるCTP検出法が確定診断に役立つことが期待されている。

内・外リンパは内耳の中を満たす液体で, それぞれ内リンパ腔(図1の赤い部分), 外リンパ腔(図1の青い部分)に存在する。音波は空気の振動としてリンパへ伝わり蝸牛有毛細胞を刺激し音として知覚される。またリンパの流動は半規管を刺激し平衡機能を司っている。つまり内耳のリンパは, 聴覚・平衡機能を司るために決定的に重要な働きをしている。外リンパ瘻は, 外リンパが内耳から中耳へ漏出することによって, 内耳の生理機能が傷害される疾患である。漏出部位は, 前庭窓, 蝸牛窓と呼ばれる内耳窓や内耳の micro-fissure などである。

2. 外リンパ瘻の原因と病態

図1に Goodhill が提唱した外リンパ瘻の発症機序を図示した。この図で, 青矢印で示されているのは外傷, いきみ, 重量物運搬などによる脳脊髄圧上昇により, 内耳から外リンパが中耳側へ漏

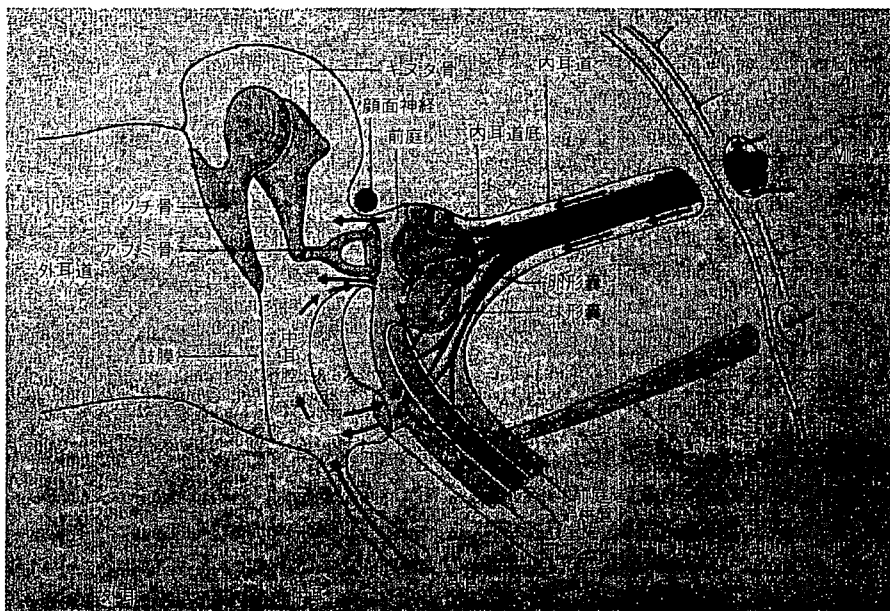


図1 外リンパ瘻の発症機序, 二つの route (文献 12) から引用)

合もある。近年、変動する感音難聴、平衡障害を呈する症例も存在することが報告され、特にメニエール病との鑑別診断が強調されている⁹⁾(表1b)。小児の変動する進行性感音難聴においても外リンパ瘻が鑑別診断となる⁶⁾。約半数に外耳道を加圧するとめまい、眼振が生ずる「瘻孔症状」を呈するものがあり診断の参考になる。

5. 確定診断法とその問題点

確定診断には、試験的鼓室開放か内視鏡によって外リンパの漏出を確認する(表3)。しかし、鼓室開放術は侵襲的検査であることからその施行がためられる場合もあり、また実際に手術を行っても外リンパの漏出が確認できず診断が確定しないケースも存在している。

6. 生化学的確定診断法は、いまだ確立されていない

そこで、術者の主観的判断に左右されず、客観的に診断できる生化学的確定診断マーカーを模索して、様々な物質が報告されてきた。Prostaglandin D synthase⁶⁾をマーカーとした報告があるが、これらの物質は血液中にも存在することから外リンパ瘻の診断には適していなかった。また、内耳特異的蛋白 OCP 1, 2 が報告されたが⁷⁾その後、外リンパ瘻の診断に応用された報告はない。蛍光色素を髄腔に注入して外リンパ瘻の指標にする方法も試されたが、色素が血液中、中耳滲出液にも移行するため、臨床外リンパ瘻の診断はできなかつた⁸⁾。髄液漏の診断に用いられる $\beta 2$ transferrin は、髄液中に存在するが血清中には含まれていない。そこで外リンパ瘻の診断にも応用できるのではないかと期待され多くの論文が発表された。しかし最近、より精度の高い検査法でヒト外リンパ20検体を検査したところ、 $\beta 2$ transferrin 陽性は1例もなかったことが報告された⁹⁾。今まで最も報告の多かった $\beta 2$ transferrin であるが、その有無で外リンパ瘻診断を行うことはできないことが判明した。以上のように、現在臨床的に確立した診断マーカーは存在しない。

7. 内耳プロテオーム解析と cochlin のアイソフォーム

一方、われわれは内耳に発現する遺伝子を蛋白

表3 外リンパ瘻の診断基準平成2年度(案)(抜粋)
(厚生省特定疾患急性高度難聴調査研究班平成2年度研究業績報告書. p 20 1991)

<p>1. 確実例 手術(鼓室開放術)、内視鏡などにより前庭窓、蝸牛窓のいずれかまたは両者より外リンパあるいは髄液の漏出を確認できた例、または瘻孔の確認できた例</p> <p>2. 疑い例 髄液圧、鼓室圧の急激な変動を起こすような誘因の後に、耳閉塞感、難聴、耳鳴り、めまい、平衡障害などが生じた例</p>
--

レベルで解析するため内耳プロテオーム解析を行った。プロテオーム解析とは各臓器の発現蛋白の種類・量を明らかにする研究手法である。われわれは特に常染色体優性遺伝性難聴・DFNA 9の原因遺伝子 *COCH* の蛋白産物である cochlin 蛋白に着目し、そのアイソフォーム(同一遺伝子から生じた複数の分子種のこと)p 63, p 44, p 40を内耳組織中に同定、*COCH* 遺伝子発現の多様性を明らかにした(図2a)。これらのアイソフォーム発現パターンの解析の結果、外リンパ中にも cochlin のアイソフォームが存在することを見出し、この蛋白を CTP (cochlin-tomoprotein, cochlinの末端が切断された蛋白という意味)と名づけた(図2b)¹⁰⁾。

さらに CTP の発現パターンを調べてみた。人工内耳、アブミ骨手術、半規管瘻孔の術中に漏出したヒト外リンパ全検体が明らかに CTP 陽性だった。一方、中耳に存在し得るほかの体液、つまり髄液、血液、中耳洗浄液、慢性中耳炎の耳漏、滲出性中耳炎の滲出液を検査したところ、これらは全検体陰性であった。この結果は、CTP が外リンパ瘻診断の生化学的マーカーとして十分な発現特異性を兼ね備えていることを示している¹¹⁾。

8. CTP は外リンパ瘻の診断マーカーになりうるか

CTP 検出法を臨床検査法として確立する場合、最も大切なことはその診断特異性である。特異性が高ければ偽陽性が少ない。外リンパ瘻疑い例に対して内耳窓閉鎖術を行うかどうか、CTP 検出法の結果を術前の診断確定法として用いるためには、まず偽陽性が低いことが求められる。不必要

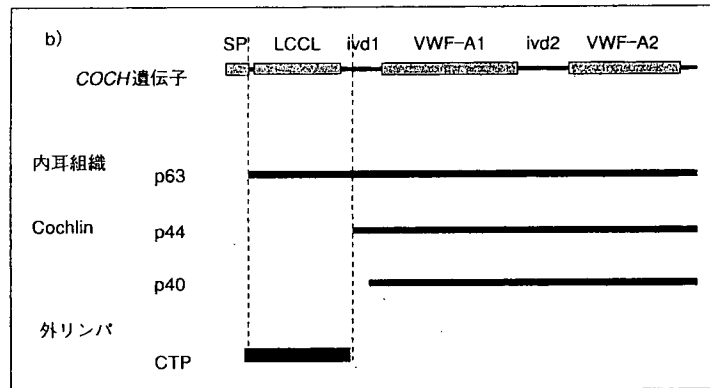
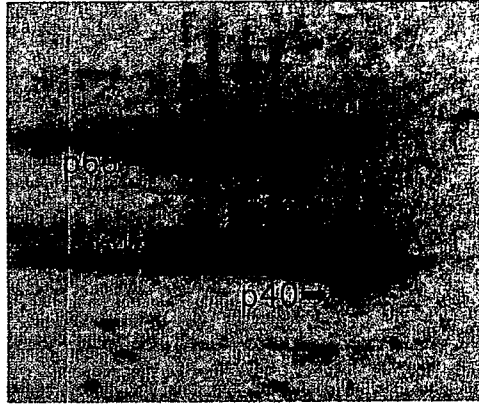


図2 内耳プロテオーム解析結果(2次元電気泳動結果)(a)と外リンパ瘻の生化学的診断マーカーCTPの構造(b)

- a) : cochlinは三つの異なるN末端をもち、分子量がそれぞれ63 kDa, 44 kDa, 40 kDaの3種類のアイソフォーム p63, 44, 40 に分類される。それぞれ、等電点の異なる8個, 5個, 3個のサブタイプをもつ。
- b) : 青線はCOCH遺伝子のモチーフ解析。内耳組織にはp63, p44, p40のアイソフォームが発現している。外リンパ中には16 kDaのCTPが発現している。

な手術的(侵襲的)治療を行わないためである。上記のようにCTPの外リンパ特異性は100%であったことから本検査は確定診断に非常に適しているといえよう。さらに、内耳窓閉鎖術によって治療し得る疾患をもれなく正確に診断するため(偽陰性を低くする)には、その感受性を向上させる必要がある。このためには、CTP検出抗体の特異感度の改善、ならびに検査システムの改善が求められ、現在モノクローナル抗体などの数種類の抗体を作成し基礎研究を進めている。

文献

- 1) Nomura Y: Perilymph fistula: concept, diagnosis and management. Acta Otolaryngol Suppl 514: 52-54, 1994
- 2) Jackler RK, Brackmann D: Neurootology. Mosby, St. Louis, pp 640-642, 1994
- 3) Grimm RJ, Hemenway WG, Lebray DR, et al: The perilymph fistula syndrome defined in mild head trauma. Acta Otolaryngol Suppl 464: 1-40, 1989
- 4) 深谷卓, 野村恭也: 外リンパ瘻; メニエール病との鑑別診断. 日本耳鼻咽喉科学会会報 93: 2009-2013, 1990

- 5) Weber PC, Bluestone CD, Perez B : Outcome of hearing and vertigo after surgery for congenital perilymphatic fistula in children. *Am J Otolaryngol* 24 : 138-142, 2003
- 6) Bachmann G, Nekic M, Michel O, et al : Traces of perilymph detected in epipharyngeal fluid : perilymphatic fistula as a cause of sudden hearing loss diagnosed with beta-trace protein (prostaglandin D synthase) immunoelectrophoresis. *J Laryngol Otol* 115 : 132-135, 2001
- 7) Thalmann I, Kohut RI, Ryu J, et al : Protein profile of human perilymph ; in search of markers for the diagnosis of perilymph fistula and other inner ear disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 111 : 273-280, 1994
- 8) Gehrking E, Wisst F, Remmert S, et al : Intraoperative Assessment of Perilymphatic Fistulas With Intrathecal Administration of Fluorescein. *Laryngoscope* 112 : 1614-1618, 2002
- 9) Rauch SD : Transferrin microheterogeneity in human perilymph. *Laryngoscope* 110 : 545-552, 2000
- 10) Ikezono T, Shindo S, Li L, et al : Identification of a novel cochlin isoform in the perilymph ; insights to cochlin function and the pathogenesis of DFNA 9. *Biochem Biophys Res Commun* 314 : 440-446, 2004
- 11) 池園哲郎 : 内耳プロテオーム解析を応用した外リンパ瘻の新たな診断法の開発・治療指針の作成に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金感覚器障害研究事業 平成16年度報告書, pp 1-6, 2005
- 12) 馬場俊吉 : 新 図説耳鼻咽喉科・頭頸部外科講座, 第1巻内耳, p 75, メジカルビュー, 2000

(日本医科大学耳鼻咽喉科・講師 池園哲郎)

外リンパ瘻中耳洗浄液 解析のお知らせ

下記の要領で採取したサンプルをお送り頂ければ、「レトロスペクティブな検討」になりますが、後日結果をお知らせします。現在、検査所用時間の関係で術前診断は行っておりません。

外リンパ瘻症例のサンプル採取方法

中耳洗浄液の回収量は症例により様々で、おそらく中耳腔の大きさの個人差によるものと思われる。われわれが行っている方法は下記の通りです。

(1) 対象症例は下記の通りです。

- a. 外リンパ瘻診断基準に基づいて、もしくは明らかな直達外傷、手術などの病歴がある場合に、試験的鼓室開放術を行った症例。
- b. 外来で鼓膜切開後に中耳を洗浄し回収した洗浄液
- c. 側頭骨折に伴い生じた髄液耳漏などの外耳道からの滲出液、中耳にたまった血腫や滲出液はそのまま回収して(3)へ進みます。

a, b においては鼓室に血液がなるべく混入しないように注意して、生理食塩水を入れて中耳を3~4回洗浄します。

- (2) 生理食塩水は0.3 ml 入れて0.1 ml 回収するようにしています。0.1 ml 回収できないときはさらに0.1 ml を入れて洗浄回収します。検査感度を向上させるため、極力洗浄液が希釈されないようにしています。
- (3) 洗浄液をエッペンドルフチューブに入れ、エッペンドルフ用遠心器で6,000回転15秒遠心沈殿します。遠心器が近くにない場合は30分間静置し上澄みを採取し、赤血球を除去して上清を-20°~-70°で凍結保存します。
- (4) 下記へご連絡頂いたうえて、ご郵送願います。

☎ 113-8603

東京都文京区千駄木 1-1-5

日本医科大学耳鼻咽喉科医局 池園哲郎

電話 03-3822-2131 fax 03-5685-0830

tikezono@nms.ac.jp